

明 細 書

アリサイクロバチラス属菌検出用プライマー

技術分野

- [0001] 本発明は、アリサイクロバチラス(*Alicyclobacillus*)属菌、もしくはアリサイクロバチラス・アシドテレストリス(*Alicyclobacillus acidoterrestris*)菌の16S rDNAに特異的なプライマーに関する。さらに詳しくは、本発明は、アリサイクロバチラス属菌の16S rDNAの特定領域を増幅可能なアリサイクロバチラス属菌検出用プライマーまたはプライマーセットならびにアリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌の16S rDNAの特定領域を増幅可能なアリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌検出用プライマーセットに関する。さらに、本発明は、前記菌検出用プライマーまたはプライマーセットを等温遺伝子増幅法(以下、LAMP法という)に使用する、アリサイクロバチラス属菌、もしくはアリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌の検出・菌株の識別方法にも関する。

背景技術

- [0002] アリサイクロバチラス属菌は、好氣的に高温・酸性下で増殖する芽胞形成細菌であり、土壌や温泉等から分離されている。土壌中に存在するアリサイクロバチラス属が収獲果実に付着し、搾汁工程で果汁に入り込んだような場合、その果汁を使用した飲料水や食品の製造においては、製造工程で加熱殺菌が行われていたとしても、菌の耐熱性胞子が生き残り、製品中で発芽・増殖して変敗事故を引き起こす可能性のあることが知られている。特に、アリサイクロバチラス属菌のうち、グアヤコール臭という悪臭を出すアリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌が、汚染事故の原因菌として報告されており、問題視されている。
- [0003] そこで、汚染事故を未然に防ぐために、アリサイクロバチラス属細菌の検出や識別の為に、微生物検査がなされており、幾つかの方法が提案されてきた。例えば、BAM培地(非特許文献1)やSemi合成培地(非特許文献2)などが検出培地として報告されているが、これらの培地組成は複雑で、また、検査結果を得るまでに数日を必要とするため、日々の微生物検査に使用するには問題がある。

[0004] 一方、菌種の識別法としては、生理・生化学的性状が菌種間であまり差がないこと、同一種内の菌株間で性状がばらつくことから、これらの性状のみで、種を識別することは難しい(非特許文献3)。

[0005] そこで、遺伝子解析的手法を用いた識別法が提案されてきた。例えば、PCR法を用いた方法(特許文献1、非特許文献4)、RAPD法を用いた方法(非特許文献5)、16S rDNAの配列の比較による方法(非特許文献6)などであるが、何れの場合も高価な機器を必要とし、また、煩雑な操作を伴うため、日々の微生物検査に使用するには問題がある。

[0006] 特許文献1:国際特許公開WO 01/68914号パンフレット

非特許文献1:G. Deinhardら, System. Appl. Microbiol. , 10, 47-53, 1987

非特許文献2:B. Hippchenら, Arch. Microbiol. , 129, 53-55, 1981

非特許文献3:K. Goto, J. Antibact. Antifung. Agents. , 28(8), 499-508, 2000

非特許文献4:K. Yamazakiら, Lett. Appl. Microbiol. , 23, 350-354, 1996

非特許文献5:K. Yamazakiら, Biosci. Biotech. Biochem. , 61(6), 1016-1018, 1997

非特許文献6:K. Gotoら, J. Gen. Appl. Microbiol. , 48, 243-250, 2002

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0007] 上記の問題点に鑑み、従来技術の手法とは別の観点から、簡便で、迅速なアリサイクロバチラス属菌(特に、アリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌)の検出法および識別法の開発が望まれている。したがって、本発明の目的は、前記の課題を解決し、飲料や果汁などの食品検体中、アリサイクロバチラス属菌の有無について、簡便で、迅速な検出・識別法を提供することである。

課題を解決するための手段

- [0008] 本発明者らは、かかる課題を解決するべく検討を重ね、等温の遺伝子増幅反応であるLoop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法 (国際特許公開W O 00/28082号パンフレット) を利用することにより、アリサイクロバチラス属菌およびアリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌の検出、識別を簡便、迅速に行い得ることを見出した。
- [0009] すなわち、本発明はアリサイクロバチラス属菌、もしくはアリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌の16S rDNAに特異的なプライマーを提供する。
- [0010] また、本発明によれば、被検アリサイクロバチラス属菌 (好ましくは、アリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌) の検出・識別方法であって、その菌の16S rDNAの特定領域を標的とし、16S rDNAに特異的なプライマーで該16S rDNAの特定領域を選択的にLAMP法により増幅させ、該増幅産物の有無を確認することを特徴とする、アリサイクロバチラス属菌の検出・識別方法が提供される。
- [0011] より特定のには、本発明は、下記の(1)ー(13)に記載される、アリサイクロバチラス属菌もしくはアリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌検出用プライマーまたはプライマーセットおよびそれらを用いる、アリサイクロバチラス属菌、もしくはアリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌の検出・識別方法などを提供する。
- [0012] (1)アリサイクロバチラス属菌の16S rDNA遺伝子配列の81番から934番の核酸配列の一部またはその相補鎖から選択される標的領域の塩基配列を増幅し、
(a)第1のセグメントとして、アリサイクロバチラス属菌の16S rDNAにアニールしてプライマーとして機能する塩基配列と、
(b)第2のセグメントとして、第1のセグメントの3'側の核酸配列に相補的であり、第1のセグメントの5'側に位置する塩基配列と
を含むことを特徴とする、プライマー。
- (2)配列番号1ー4で表される核酸配列からなるオリゴヌクレオチドセットからなり、アリサイクロバチラス属菌の16S rDNAの特定領域を増幅可能なアリサイクロバチラス属菌検出用プライマーセット。
- (3)配列番号5ー8で表される核酸配列からなるオリゴヌクレオチドセットからなり、アリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌の16S rDNAの特定領域を増幅可能なアリサ

イクロバチラス・アシドテレストリス菌検出用プライマーセット。

(4) 配列番号9〜13で表される核酸配列からなるオリゴヌクレオチドセットからなり、アリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌の16S rDNAの特定領域を増幅可能なアリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌検出用プライマーセット。

(5) 検体中に存在するアリサイクロバチラス属菌の検出方法であって、該アリサイクロバチラス属菌の16S rDNAの特定領域を標的とし、上記(1)に記載のプライマーで該16S rDNAの特定領域を選択的にLAMP法により増幅させ、該増幅産物の有無を確認することを特徴とする、アリサイクロバチラス属菌の検出方法。

(6) 検体中に存在するアリサイクロバチラス属菌の検出方法であって、該アリサイクロバチラス属菌の16S rDNAの特定領域を標的とし、上記(2)に記載のプライマーセットで該16S rDNAの特定領域を選択的にLAMP法により増幅させ、該増幅産物の有無を確認することを特徴とする、アリサイクロバチラス属菌の検出方法。

(7) 検体中に存在するアリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌の検出方法であって、該アリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌の16S rDNAの特定領域を標的とし、上記(3)に記載のプライマーセットで該16S rDNAの特定領域を選択的にLAMP法により増幅させ、該増幅産物の有無を確認することを特徴とする、アリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌の検出方法。

(8) 検体中に存在するアリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌の検出方法であって、該アリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌の16S rDNAの特定領域を標的とし、上記(4)に記載のプライマーセットで該16S rDNAの特定領域を選択的にLAMP法により増幅させ、該増幅産物の有無を確認することを特徴とする、アリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌の検出方法。

(9) 検体を増菌培養し、出現菌からDNA試料を分離し、該DNA試料に対して上記(1)に記載のプライマーを用いてLAMP法により増幅反応を行い、アリサイクロバチラス属菌の16S rDNAの特定領域を増幅させ、この増幅産物の有無を確認することを特徴とする、アリサイクロバチラス属菌の識別方法。

(10) 検体を増菌培養し、出現菌からDNA試料を分離し、該DNA試料に対して上記(2)に記載のプライマーセットを用いてLAMP法により増幅反応を行い、アリサイク

ロバチラス属菌の16S rDNAの特定領域を増幅させ、この増幅産物の有無を確認することを特徴とする、アリサイクロバチラス属菌の識別方法。

(11)検体を増菌培養し、出現菌からDNA試料を分離し、該DNA試料に対して上記(3)に記載のプライマーセットを用いてLAMP法により増幅反応を行い、アリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌の16S rDNAの特定領域を増幅させ、この増幅産物の有無を確認することを特徴とする、アリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌の識別方法。

(12)検体を増菌培養し、出現菌からDNA試料を分離し、該DNA試料に対して上記(4)に記載のプライマーセットを用いてLAMP法により増幅反応を行い、アリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌の16S rDNAの特定領域を増幅させ、この増幅産物の有無を確認することを特徴とする、アリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌の識別方法。

(13)上記(1)～(4)のいずれか1つに記載のプライマーまたはプライマーセット、鎖置換型DNAポリメラーゼ、dNTPs、反応緩衝液を少なくとも含むことを特徴とする、アリサイクロバチラス属菌もしくはアリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌検出用キット。

[0013] 上記の(1)～(4)の所定のプライマーまたはプライマーセットをLAMP法に使用すると、アリサイクロバチラス属菌の16S rDNAの特定領域にアニールする。これをLAMP法で定める増幅条件のもとで増幅すると特定の遺伝子領域が増幅される。このような増幅産物の有無は、電気泳動法または、簡易検出法によって確認する。このようにして、アリサイクロバチラス属菌が検出できる。上記の(3)または(4)の2組のプライマーセットは、アリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌(16S rDNA)に特異的であるので、アリサイクロバチラス属菌の中で、アリサイクロバチラス・アシドテレストリス種の菌株のみを特異的に検出するから、これらのプライマーセットは、アリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌とその他のアリサイクロバチラス属菌との識別にも使用できる。

[0014] また、本発明の検出方法を特定の検体(例えば、飲料試料)に適用するとき、検体から採取した雑菌を培養してDNA試料を分離し、このDNA試料に上記の(1)～(4)

)の所定のプライマーまたはプライマーセットを作用させ、同様に増幅されたDNA増幅産物の有無を確認する。このようにして、アリサイクロバチラス属菌もしくはアリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌が検出できる。

発明の効果

- [0015] 本発明は、配列番号1〜4、5〜8、または9〜13で表される核酸配列からなるオリゴヌクレオチドセットからなるプライマーセットをLAMP法に使用して、アリサイクロバチラス属菌(好ましくは、アリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌)の16S rDNAの特定領域を増幅して、アリサイクロバチラス属菌の検出を可能にする。
- [0016] また、本発明によるアリサイクロバチラス属菌の検出方法は、配列番号1〜4、5〜8、または9〜13で表される核酸配列からなるオリゴヌクレオチドセットからなるプライマーセットを用いて、検体から得られたDNA試料にLAMP法を施し、増幅産物の有無を確認することからなるので、アリサイクロバチラス属菌(特に、有害アリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌)の検出・識別を簡易、迅速かつ確実に行える。

図面の簡単な説明

- [0017] [図1]図1は、Alプライマーによる等温遺伝子増幅を行った結果を示す電気泳動図である。M:マーカー、Bc:Bacillus coagulans ID237、Pp:Paenibacillus polymyxa ID322-1、Bl:Bacillus licheniformis ID354-1、Aat:Alicyclobacillus acidoterrestris DSM2498、Ac:Alicyclobacillus cycloheptanicus NBRC15310、Aac:Alicyclobacillus acidocaldarius JCM5260。
- [図2]図2は、Alatプライマーによる等温遺伝子増幅を行った結果を示す電気泳動図である。レーンM:マーカー、Ac:Alicyclobacillus cycloheptanicus NBRC15310、Aac1:Alicyclobacillus acidocaldarius JCM5260、Aac2:Alicyclobacillus acidocaldarius ID313-1、Aac3:Alicyclobacillus acidocaldarius ID313-3、Aat1:Alicyclobacillus cycloheptanicus NBRC15310、Aat2:Alicyclobacillus acidocaldarius JCM5260、Aat3:Alicyclobacillus acidoterrestris ID313-4、Aat4:Alicyclobacillus acidoterrestris ID331-1。
- [図3]図3は、rAlatプライマーによる増幅等温遺伝子増幅を行った結果を示す電気泳動図である。Am:Alicyclobacillus mali IAM14936、Ap:Alicyclobacillus

pomorum IAM14988、Aap:Alicyclobacillus acidiphilus IAM14883、Aat:Alicyclobacillus acidoterrestris DSM2498、Ac:Alicyclobacillus cycloheptanicus NBRC15310、Aac:Alicyclobacillus acidocaldarius JCM5260、Aac:Alicyclobacillus acidocaldarius JCM5260。

発明を実施するための最良の形態

- [0018] 本発明は、果汁および果汁飲料等(集合的に飲料ともいう)を含む食品に、アリサイクロバチラス属菌や特に、アリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌が存在するか否かを判定するために、前記細菌に特異的なオリゴヌクレオチドプライマーを用いたLAM-PCR法による等温遺伝子増幅により、菌の16S rDNAの特定領域の増幅を行い、増幅産物の有無を確認することを基礎としている。
- [0019] 飲料工場では、果汁受入時や果汁飲料の微生物検査において、アリサイクロバチラス属菌の存在有無のチェックを行っている。一般的には、「耐熱性好酸性菌統一検査法」(果汁協会報、3月号、No. 535、4-12、2003)に従って、飲料検体をメンブランフィルターで濾過し、菌を捕捉したメンブランフィルターをアリサイクロバチラス属用培地YSG寒天培地(酵母エキス:0.2%、グルコース:0.1%、可溶性デンプン:0.2%、寒天:1.5%、pH4.0)に置き、45℃で3-5日培養する。出現してきた菌について、温度差法(判定に18-20時間が必要)やペルオキシダーゼ法(判定に1-3時間が必要)により、その菌がアリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌であるか否かを判定している。
- [0020] 一方、メンブラン濾過が困難な検体の場合は、その検体をYSG液体培地に添加し、45℃で3-5日間増菌培養後、培養液をYSG寒天培地に塗布し、さらに45℃で3-5日培養する。出現してきた菌について、上記と同様に、温度差法やペルオキシダーゼ法により、アリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌であるか否かを判定している。
- [0021] 本発明の検出・識別法には、サンプルとしてYSG寒天培地で出現した菌や、増菌培養液中に存在する菌を供することができる。
- [0022] なお、本明細書で使用する「検体」とは、有害菌アリサイクロバチラス・アシドテレストリスを含む可能性があり、本発明の検出・識別法の対象となるサンプルであるが、特

に限定はない。例えば、果汁(原料)、果汁を含む飲料等を挙げることができる。また、本明細書で使用する「識別」とは、アリサイクロバチラス属菌の1種以上が存在する検体において、アリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌とその他のアリサイクロバチラス属菌を区別して、検出することを特に指す場合もあるが、一般的には複数の菌種のなかで検出対象であるアリサイクロバチラス属菌もしくはアリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌を識別することを指す。また、本明細書で使用する「判定」とは、検出した菌がアリサイクロバチラス属菌であるか否か、或いはアリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌か否かを判定することを指し、検出と同義に使用されることもある。

[0023] 本発明で使用されるLAMP法は、PCR法と異なり、増幅工程での温度調節(サイクル)を不要とし、一種類のDNA合成酵素を用いて、一定温度(等温)で増幅する遺伝子増幅法である(国際特許公開WO00/28082号パンフレット、前掲)。

[0024] 本発明のアリサイクロバチラス属菌の16S rDNAに特異的なプライマーは、特定領域を標的とする、ループを形成する2種類の内部プライマーと2種類の外部プライマーの計4種類のセット(FIP、F3、BIP、B3)として設計する。増幅する遺伝子の特定領域は、100〜500bp程度である。プライマーのオリゴヌクレオチドの核酸配列が決定されると、オリゴヌクレオチド自身の合成は、公知の手段、例えば、パーキンエルマー社製の自動DNA合成装置を用いて実施できる。

[0025] 本発明において、アリサイクロバチラス属菌に特異的なプライマーセットとして、例えば下記の1組のプライマーセット(AIプライマーセットという)を挙げることができる。ここで、アリサイクロバチラス属菌に特異的なプライマーとは、その菌の16S rDNAの特定領域(141bp)を特異的に増幅可能なプライマーである。なお、16S rDNAの全核酸配列を配列表の配列番号14に示す。

[0026] (AIプライマーセット)

AI-FIP

5'-TTGGGTTTCCTTCGGCACTGAGATACCCTGGTAGTCCACG-3' (配列番号1)

AI-BIP

5'-ATAAGCACTCCGCCTGGGGAGCCCCCGTCAATTCCTTTG-3' (配列番号2)

号2)

Al-F3

5'-GTGGGGAGCAAACAGGATT-3' (配列番号3)

Al-B3

5'-ACATGCTCCACTGCTTGTG-3' (配列番号4)

[0027] 本発明において、アリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌のみに特異的なプライマーセットとして、例えば下記の2組のプライマーセット(Alatプライマーセット、rAlatプライマーセット)を挙げることができる。ここで、アリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌のみに特異的なプライマーとは、アリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌の16S rDNAの特定領域(139bpもしくは146bp)を増幅可能であるが、他のアリサイクロバチラス属菌の遺伝子を増幅しないプライマーである。

[0028] (Alatプライマーセット)

Alat-FIP

5'-ACAAGGAGCTTTCCACTCTCCAAGAAGGCCTTCGGGTTGT-3' (配列番号5)

Alat-BIP

5'-TGAGACGGTACCGAGTGAGGACGCTTGCCCCCTACGTATT-3' (配列番号6)

Alat-F3

5'-CAAGCCTGACGGAGCAA-3' (配列番号7)

Alat-B3

5'-CCCAGTGATTCCGGACAA-3' (配列番号8)

[0029] (rAlatプライマーセット)

rAlat-FIP

5'-AACACAAGTAGATGCCTACCCGCAATCTGCCTTTCAGACTGGA-3' (配列番号9)

rAlat-BIP

5'-TTGAAAGATGCAACTGCATCGCTCCGTTACCTCACCAACTAGC-3' (

配列番号10)

rAlat-F3

5'-CGGACGGGTGAGTAACACG-3' (配列番号11)

rAlat-B3

5'-TACGCATCGTCGCCTTGG-3' (配列番号12)

rAlat-LoopF

5'-ATTAGCACCCGTTTCCGAGT-3' (配列番号13)

- [0030] 検体中に存在するアリサイクロバチラス属菌および／またはアリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌の検出は、上記した3組のプライマーセットの少なくとも1組のセットを用いてLAMP法に従い、等温遺伝子増幅(通常60～65℃で15分～1時間)を行う。すなわち、検体から採取した菌株または飲料検体そのものを適当な培地中で培養し、遠心分離等で集菌した後、公知の方法によって菌株のDNAを分離して、このDNAに対して前記プライマーセットを用いて増幅反応を行う。増幅したDNA増幅産物の有無は、LAMP法での簡易検出、或いは通常の電気泳動によって検出できる。前者の簡易検出には、1)増幅反応液の白濁による目視確認(国際特許公開WO 01/83817号パンフレット)および2)蛍光インターカレーターの目視確認がある。いずれも、目視により増幅産物(標的遺伝子の存在)の有無を確認することができる。

実施例

- [0031] 以下、実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

- [0032] (実施例1) 既知菌株の16S rDNA遺伝子の増幅

- [0033] (使用したプライマーセット)

アリサイクロバチラス属菌用プライマーセット[Alプライマーセット:Al-FIP(配列番号1)、Al-BIP(配列番号2)、Al-F3(配列番号3)、Al-B3(配列番号4)]は、16S rDNAの一部(141bp)を増幅する。アリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌用プライマーセット1[Alatプライマーセット:Alat-FIP(配列番号5)、Alat-BIP(配列番号6)、Alat-F3(配列番号7)、Alat-B3(配列番号8)]は、16S rDNAの一部(139bp)を増幅する。また、アリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌用プライマーセ

ト2[rAlatプライマーセット:rAlat-FIP(配列番号9)、rAlat-BIP(配列番号10)、rAlat-F3(配列番号11)、rAlat-B3(配列番号12)、rAlat-LoopF(配列番号13)]は、16S rDNAの一部(146bp)を増幅する。これらのプライマーセットによるアリサイクロバチラス属菌、アリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌の16S rDNAの増幅、および近縁菌の16S rDNAの増幅について検討した。本実施例に供試した菌株を、各菌株に対する結果と共に表1に示した。

[0034] (ゲノムDNAの調製)

アリサイクロバチラス属菌は、YSG寒天培地(酵母エキス:0.2%、グルコース:0.1%、可溶性デンプン:0.2%、寒天:1.5%、pH4.0)に植菌し、45℃で2～5日間培養を行った。その他の供試菌は、ハートインフージョン寒天培地(栄研化学社製)に植菌し、37℃で2～5日間培養を行った。培養後、各菌体からPrepMan(商標)Ultra(アプライド・バイオシステム社製)を用いてゲノムDNAを抽出した。

[0035] (LAMP法による遺伝子増幅)

LAMP法による遺伝子増幅はLoopamp DNA増幅試薬キット(栄研化学社製)を用いて行った。試薬反応液に上記DNA抽出液および各プライマーセットを加え、62℃にて60分間、核酸の増幅反応を行った。

[0036] (増幅産物の検出)

増幅反応が進むにつれ遊離してくるピロリン酸と、反応液中に存在するマグネシウムイオンとがピロリン酸マグネシウムを形成する。したがって、核酸の増幅が生じたサンプルにおいてのみ、反応液が白濁する。この白濁を観察することで、増幅産物の有無を判断した。また、一部の菌株については、増幅後の反応液1μlをポリアクリルアミドゲル上で電気泳動にかけた。エチジウムブロマイド溶液で10分間染色した後、紫外線照射してDNAのバンドを確認した(図1～3に結果を示した)。

[0037] AlプライマーおよびAlatプライマーについての増幅結果をまとめたものが表1である。

[0038] [表1]

供試菌株	増幅の有無	
	Al プライマー	Alat プライマー
<i>Alicyclobacillus cycloheptanicus</i> IF015310	+	—
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> JCM5260	+	—
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> ID313-1	+	—
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> ID313-3	+	—
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> DSM2498	+	+
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> ID313-2	+	+
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> ID313-4	+	+
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> ID331-1	+	+
<i>Bacillus coagulans</i> AHU1366	—	—
<i>Bacillus coagulans</i> AHU1367	—	—
<i>Bacillus coagulans</i> ID237	—	—
<i>Bacillus licheniformis</i> AHU1371	—	—
<i>Bacillus licheniformis</i> ID351-4	—	—
<i>Bacillus polymyxa</i> IAM1189	—	—
<i>Paenibacillus polymyxa</i> ID322-1	—	—

＋ ： 増幅する — ： 増幅せず

NBRC: Biological Resource Center, Biotechnology Center, National Institute
Technology and Evaluation, Tsukuba, Japan

JCM: Japan Collection of Microorganisms, Saitama, Japan

AHU: Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Japan

IAM: IAM Culture Collection, Institute of Molecular and Cellular Biosciences,
University of Tokyo, Japan

DSM: German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Germany

ID: サッポロビール分離株

[0039] 表1に示したように、Alプライマーセットを用いたとき、アリサイクロバチラス属に属す

る全ての供試菌株で増幅産物が確認できた。一方、Alatプライマーセットを用いたとき、アリサイクロバチラス・アシドテレストリス種に属する供試菌株のみで増幅産物が確認できた。しかし、両プライマーセットとも、アリサイクロバチラス属以外の近縁菌の16S rDNAに由来するDNA抽出液を用いた場合には、増幅産物が確認されなかった。

[0040] (実施例2) 果汁から分離した菌株の識別

YSG寒天培地(酵母エキス:0.2%、グルコース:0.1%、可溶性デンプン:0.2%、寒天:1.5%、pH4.0)に、オレンジ、リンゴ、パイナップル、梅などの果汁を加えて、45℃で2～5日間インキュベートした。培地から菌株を分離し、分離した菌株に対して、実施例1と同様にしてLAMP法により核酸の増幅および増幅産物の検出を行った。増幅結果を表2に示した。

[0041] (遺伝子解析による同定)

分離菌株の同定は16S rDNAの遺伝子解析により行った。実施例1に示した方法で、ゲノムDNAを調製した後、MicroSeq 500 16S rDNAキット(アプライド・バイオシステム社製)を用いて、分離株の同定を行った。

[0042] [表2]

菌株	Al プライマー	Alat プライマー	同定結果
No. 1	+	+	<i>A. acidoterrestris</i>
No. 2	+	+	<i>A. acidoterrestris</i>
No. 3	+	—	<i>A. acidocaldarius</i>
No. 4	+	—	<i>A. acidocaldarius</i>
No. 5	+	+	<i>A. acidoterrestris</i>
No. 6	+	—	<i>A. acidocaldarius</i>
No. 7	+	—	<i>A. acidocaldarius</i>
No. 8	+	—	<i>A. acidocaldarius</i>
No. 9	+	—	<i>A. acidocaldarius</i>

+ : 増幅する — : 増幅せず

[0043] 表2に示したように、遺伝子解析の結果、分離された菌株は全てアリサイクロバチラス属に属する菌株であった。遺伝子解析による同定結果とAlプライマーを用いた識別結果とは良く一致しており、さらに、アリサイクロバチラス・テレストリス種と同定されたNo. 1株、No. 2株およびNo. 5株のみにおいて、Alatプライマーによる増幅が観察された。

[0044] (実施例3) 果汁飲料からのアリサイクロバチラス属菌の検出

Alicyclobacillus acidoterrestris DSM2498株を添加した市販の濃縮リンゴ果汁飲料1ml(10cfu/ml)を、30mlのYSG液体培地と混合し、45℃で4〜24時間静置培養した(増菌培養)。

[0045] 各培養時間におけるYSG培養液1.0mlを12,000rpmで5分間遠心し、菌体を回収した。菌体を200 μ lのTEバッファー(10mM トリス-塩酸、0.1mM EDTA、pH8.0)に懸濁した後、遠心分離して、菌体を洗浄した。洗浄した菌体を100 μ lのPrepMan(商標)Ultraに懸濁し、99℃で15分間加熱処理した後、12,000rpmで5分間遠心し、その上清をLAMP法用のDNA試料溶液とした。

[0046] 上記の方法に従って調製したDNA試料溶液1 μ lに対して、実施例1と同様にして、Alatプライマーを用いてLAMP法により核酸の増幅および増幅産物の検出を行った。

[0047] 一方、各培養時間において、培養液の一部をYSG寒天培地の播種し、生菌数を測定した。増幅の結果と生菌数の測定値を表3に示した。

[0048] [表3]

	増菌培養時間 (hr)				
	0	4	8	16	24
Alat による検出	—	—	—	+	+
生菌数 (cfu/ml)	0.3	<10	40	1x10 ⁴	6 x10 ⁵

生菌数：YSG 寒天培地で3日間(45℃)培養して測定 (cfu/ml)

[0049] 表3に示したように、一晚程度の増菌培養を行うだけで、初発菌数1cfu/ml以下(YSG液体培地における)のアリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌を、Alatプライ

マーを用いたLAMP法によって検出することができた。このように、短時間の増菌培養を行った後（本実施例では16時間）、LAMP法により目的遺伝子を検出することで、死菌の遺伝子を検出することなく、生菌を選択的に検出することができる。

[0050] 「耐熱性好酸性菌統一検査法」（果汁協会報、3月号、No. 535、4-12、2003）によれば、増菌培養に3-5日を要し、アリサイクロバチラス・アシドテレストリスか否かの判定にさらに3-5日を要する。したがって、本発明の検出方法を用いることで、菌の検出・識別までの時間を大幅に短縮することが可能である。

[0051] （実施例4）迅速微生物検査装置(RMDS-SPS)で出現した菌の識別

細胞内に存在するATPを利用して、微生物を迅速に検出するための装置としてRMDS-SPS（商標：ミリポア社-サッポロビール社製）がある。その装置で検出したコロニー（目視で見えない極微小コロニー）が、アリサイクロバチラス属菌か否かの識別の可能性を検討した。

[0052] *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM2498を添加した市販の濃縮リンゴ果汁飲料1ml(10cfu/ml)をメンブランフィルターで濾過した。菌を捕捉したメンブランフィルターをYSG寒天培地に載せ、45℃で5-8時間培養した（増菌培養）。培養後、RMDS-SPS装置を用いて検出した菌が存在するフィルター部位を切り出し、2 μ lのPrepMan（商標）Ultraをフィルターに載せ、99℃で15分間加熱処理して、DNAを抽出した。そのフィルターに対して、実施例1と同様にして、Alatプライマーを用いてLAMP法により核酸の増幅および増幅産物の検出を行った。結果を表4に示した。

[0053] [表4]

	培養時間 (hr)		
	0		8
識別の可否	×	○	○

○ : *A. acidoterrestris*と判定 × : *A. acidoterrestris*と判定できず

[0054] 表4に示したように、迅速微生物検査装置(RMDS-SPS)と組合せることにより、数時間の増菌培養を行うだけで、アリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌を、Alatプ

ライマーを用いたLAMP法によって識別することができた。

産業上の利用可能性

- [0055] 果汁飲料等の変敗事故の原因菌であるアリサイクロバチラス属菌(特に、アリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌)を選択的、迅速、簡便に、識別、検出することが可能となった。
- [0056] したがって、本発明のプライマーセットおよびそれを用いるアリサイクロバチラス属菌などの検出方法は、食品、果汁入り飲料等の製造現場で製品の品質管理に役に立つ。

請求の範囲

- [1] アリサイクロバチラス属菌の16S rDNAの81番から934番の核酸配列の一部またはその相補鎖から選択される標的領域の塩基配列を増幅し、
(a)第1のセグメントとして、アリサイクロバチラス属菌の16S rDNAにアニールしてプライマーとして機能する塩基配列と、
(b)第2のセグメントとして、第1のセグメントの3'側の核酸配列に相補的であり、第1のセグメントの5'側に位置する塩基配列と、
を含むことを特徴とする、プライマー。
- [2] 配列番号1〜4で表される核酸配列からなるオリゴヌクレオチドセットからなり、アリサイクロバチラス属菌の16S rDNAの特定領域を増幅可能なアリサイクロバチラス属菌検出用プライマーセット。
- [3] 配列番号5〜8で表される核酸配列からなるオリゴヌクレオチドセットからなり、アリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌の16S rDNAの特定領域を増幅可能なアリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌検出用プライマーセット。
- [4] 配列番号9〜13で表される核酸配列からなるオリゴヌクレオチドセットからなり、アリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌の16S rDNAの特定領域を増幅可能なアリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌検出用プライマーセット。
- [5] 検体中に存在するアリサイクロバチラス属菌の検出方法であって、該アリサイクロバチラス属菌の16S rDNAの特定領域を標的とし、請求項1に記載のプライマーで該16S rDNAの特定領域を選択的にLAMP法により増幅させ、該増幅産物の有無を確認することを特徴とする、アリサイクロバチラス属菌の検出方法。
- [6] 検体中に存在するアリサイクロバチラス属菌の検出方法であって、該アリサイクロバチラス属菌の16S rDNAの特定領域を標的とし、請求項2に記載のプライマーセットで該16S rDNAの特定領域を選択的にLAMP法により増幅させ、該増幅産物の有無を確認することを特徴とする、アリサイクロバチラス属菌の検出方法。
- [7] 検体中に存在するアリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌の検出方法であって、該アリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌の16S rDNAの特定領域を標的とし、請求項3に記載のプライマーセットで該16S rDNAの特定領域を選択的にLAMP

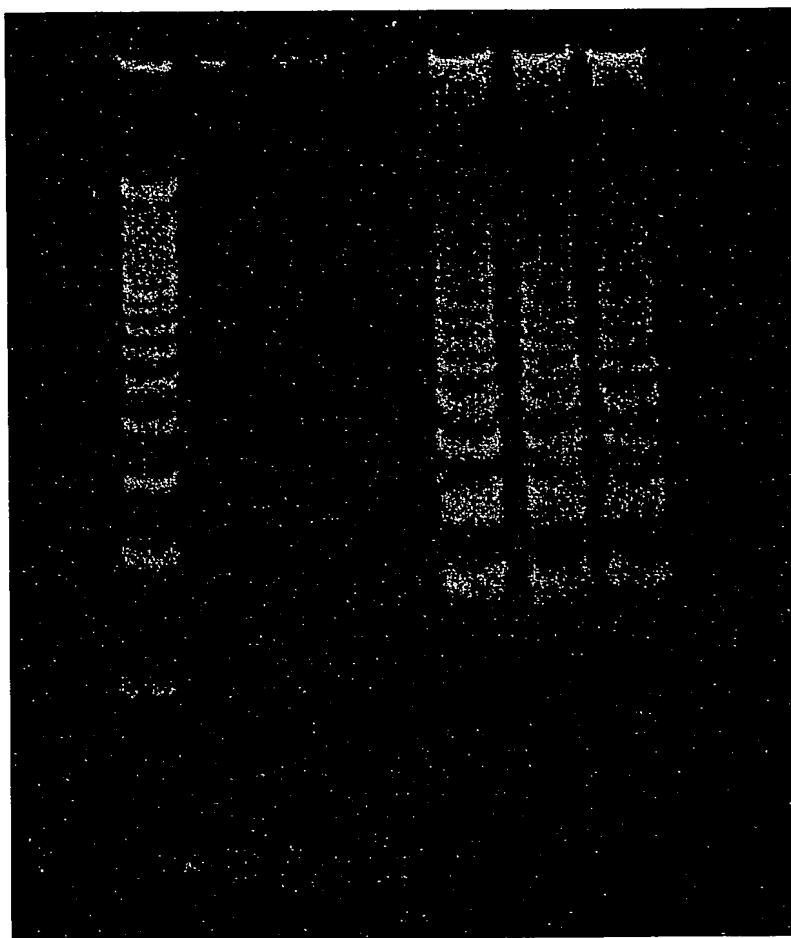
法により増幅させ、該増幅産物の有無を確認することを特徴とする、アリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌の検出方法。

- [8] 検体中に存在するアリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌の検出方法であって、該アリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌の16S rDNAの特定領域を標的とし、請求項4に記載のプライマーセットで該16S rDNAの特定領域を選択的にLAMP法により増幅させ、該増幅産物の有無を確認することを特徴とする、アリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌の検出方法。
- [9] 検体を増菌培養し、出現菌からDNA試料を分離し、該DNA試料に対して請求項1に記載のプライマーを用いてLAMP法により増幅反応を行い、アリサイクロバチラス属菌の16S rDNAの特定領域を増幅させ、この増幅産物の有無を確認することを特徴とする、アリサイクロバチラス属菌の識別方法。
- [10] 検体を増菌培養し、出現菌からDNA試料を分離し、該DNA試料に対して請求項2に記載のプライマーセットを用いてLAMP法により増幅反応を行い、アリサイクロバチラス属菌の16S rDNAの特定領域を増幅させ、この増幅産物の有無を確認することを特徴とする、アリサイクロバチラス属菌の識別方法。
- [11] 検体を増菌培養し、出現菌からDNA試料を分離し、該DNA試料に対して請求項3に記載のプライマーセットを用いてLAMP法により増幅反応を行い、アリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌の16S rDNAの特定領域を増幅させ、この増幅産物の有無を確認することを特徴とする、アリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌の識別方法。
- [12] 検体を増菌培養し、出現菌からDNA試料を分離し、該DNA試料に対して請求項4に記載のプライマーセットを用いてLAMP法により増幅反応を行い、アリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌の16S rDNAの特定領域を増幅させ、この増幅産物の有無を確認することを特徴とする、アリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌の識別方法。
- [13] 請求項1〜4のいずれか1つに記載のプライマーまたはプライマーセット、鎖置換型DNAポリメラーゼ、dNTPs、反応緩衝液を少なくとも含むことを特徴とする、アリサイクロバチラス属菌もしくはアリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌検出用キット。

[図1]

M Bc Pp B1 Aat Ac Aac

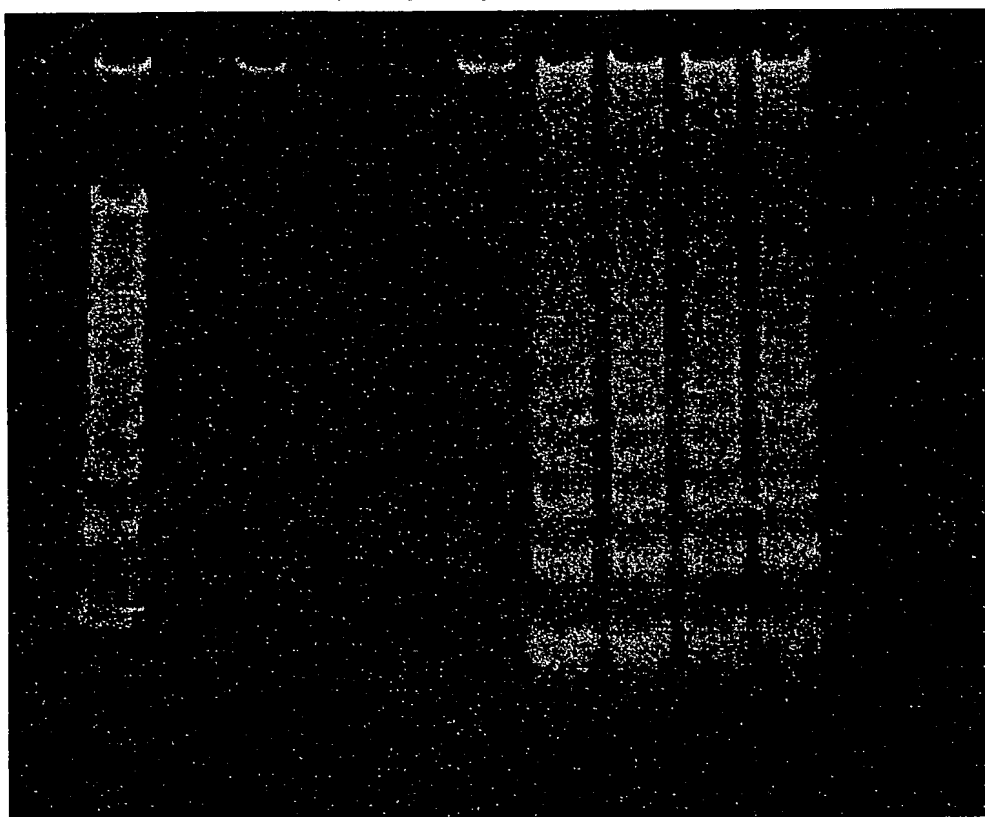
BEST AVAILABLE COPY



[☒]2

BEST AVAILABLE COPY

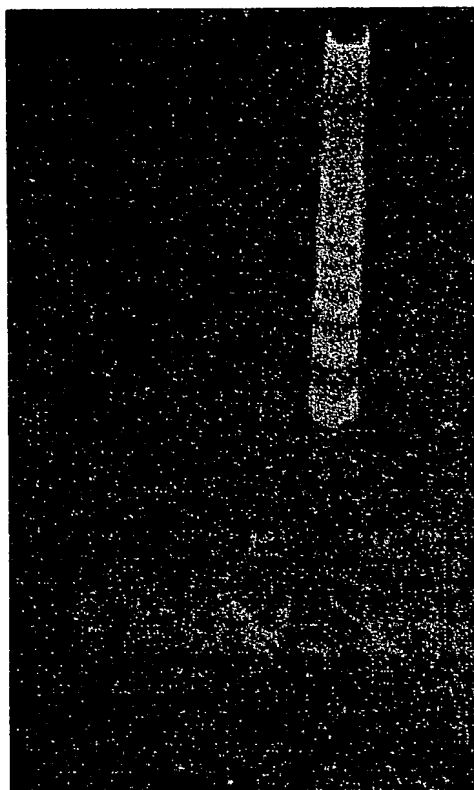
M	Ac	Aac	Aac	Aac	Aat	Aat	Aat	Aat
	1	2	3	1	2	3	4	



[☒]3

BEST AVAILABLE COPY

Am Ap Aap Ah Aat Ac Aac



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/014959

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPIDS/BIOSIS/BIOTECHABS/MEDLINE/CA (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 01/68914 A1 (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.), 20 September, 2001 (20.09.01), & EP 1273668 A1 & JP 2001-567393 A & US 2003/129621 A1 & KR 2002/89391 A & CN 1418257 A	1-13
Y	WO 02/24902 A1 (Eiken Chemical Co., Ltd.), 28 March, 2002 (28.03.02), & EP 1327679 A1 & JP 2002-529496 A & US 2004/38253 A1 & AU 2001/88065 A & CN 1474870 A	1-13



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
13 December, 2004 (13.12.04)

Date of mailing of the international search report
28 December, 2004 (28.12.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12Q1/68

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12Q1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPIDS/BIOSIS/BIOTECHABS/MEDLINE/CA (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO 01/68914 A1 (大塚製薬株式会社) 2001.09.20 & EP 1273668 A1 & JP 2001-567393 A & US 2003/129621 A1 & KR 2002/89391 A & CN 1418257 A	1-13
Y	WO 02/24902 A1 (栄研化学株式会社) 2002.03.28 & EP 1327679 A1 & JP 2002-529496 A & US 2004/38253 A1 & AU 2001/88065 A & CN 1474870 A	1-13

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

13.12.2004

国際調査報告の発送日

28.12.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

深草 亜子

4B

9548

電話番号 03-3581-1101 内線 3448